

ミコバクテリアの高級脂肪酸に及ぼすイソニコチン酸ヒドラジドの影響

著者	宗方 喜久男
号	143
発行年	1962
URL	http://hdl.handle.net/10097/17714

氏 名 むな 宗 かた 方 さ 喜 く 久 お 男

授 与 学 位 医 学 博 士

学 位 授 与 年 月 日 昭和37年3月23日

学位授与の根拠法規 学位規則第5条第1項

研究科，専攻の名称 東北大学大学院医学研究科
内科学系

学 位 論 文 題 目 ミコバクテリアの高級脂肪酸に及ぼすイソニコ
チン酸ヒドラジドの影響

指 導 教 官 東北大学教授 海 老 名 敏 明

論文審査委員 東北大学教授 海 老 名 敏 明

東北大学教授 菊 地 吾 郎

東北大学教授 古 賀 良 彦

宗形喜久男提出論文内容要旨

緒

言

イソニコチン酸ヒドラジド (INH) を作用させたミコバクテリア菌体から有機溶媒によつて抽出される画分が対照よりも減少していることは Russe and Barclay により報告されている。我々はすでにミコバクテリアの高級脂肪酸のペーパークロマトグラフィーを行い、INH 作用菌と対照菌の高級脂肪酸に差のあることを示唆した。本実験においてはミコバクテリア竹尾株の高級脂肪酸に及ぼす INH の影響を種々の点から検討した。

実験方法並びに結果

(1) 菌体および培地からの脂質の抽出—Sauton 培地に3日間培養したミコバクテリア竹尾株を集菌、半湿菌として秤量、INH 10⁷/cc を含む培地 5 倍容の中に6時間沈めた後に裏菌、洗滌、乾燥してINH作用菌を、別にINHを含まない培地に6時間沈めた菌体を同様に乾燥して対照菌を、天々調製した。これらの乾燥菌体5gからメタノール：クロロホルム(3:1)混合溶媒20倍容で、音波破壊および器械的振盪により、抽出される脂質を乾燥して菌体の脂質とした。一方培地350ccから2倍容のエーテルで連続抽出されるものを乾燥して培地中の脂質とした。この抽出条件のもとで菌体から抽出される総脂質量はINH作用菌の方が低い値を示した。INH 10⁷/ccを含む培地中の脂質も対照よりは少い。(2) ガスクロマトグラフィーによるミコバクテリア高級脂肪酸の分析—乾燥竹尾株菌体4gからメタノール：クロロホルム(3:1)混合溶媒10倍容で連続抽出して得られる抽出物を1規定苛性カリで鹼化、鹼化画分を3規定塩酸で酸性とし、エーテルおよびリグロインで繰り返し加温抽出した。これを一定量まで濃縮の後、過剰のジアゾメタンのエーテル溶液を添加して脂肪酸のメチルエステルを調製し、n-ヘプタン1.2ccに溶解、その0.08ccをガスクロマトグラフィーにかけた。得られたクロマトグラム上の各々のピークを切りとり、紙の重量を微量化学天秤で秤量し、各々の脂肪酸を比較した。INH作用菌の高級脂肪酸(炭素鎖C₁₄乃至C₂₄)の総量は対照に比し有意の減少を示していた。しかしながらその組成においては対照とINH作用菌との間に著差を認め得なかつた。(3) 脂肪酸合成系において1-¹⁴C酢酸の高級脂肪酸への取り込み(incorporation)に及ぼすINHの影響—Sauton 培地上37℃で3日間培養した竹尾株から粗抽出液を調製し、次の系を用い

て脂肪酸合成実験を行つた。アデノシンミチン酸2カリウム塩, $5 \mu \text{ moles}$; 重曹, $8 \mu \text{ moles}$; 0.1 M 炭酸緩衝液, $30 \mu \text{ moles}$; $1-^{14}\text{C}$ 標識酢酸ソーダ, $4 \mu \text{ moles}$; 塩化マグネシウム, $0.5 \mu \text{ moles}$; 粗抽出液, 2.0 cc ; INH , 30γ ; 水を加えて全量を 3.0 cc 。対照としては INH を除き同様の組成を有する系を用いた。これら混合液を 30°C , 2 時間反応させた後, 苛性カリ溶液で鹼化し, 鹼化部分を塩酸で酸性とし, エーテルおよびリグロインで加温抽出した。この抽出物に担体として非標識ミリスチン酸, パルミチン酸, ステアリン酸, アラキジン酸を加えて, Silk and Hahn の方法に従い脂肪酸の逆相カラムクロマトグラフィーを行つた。溶離液は 2 cc ずつ試験管に分離し, 一部は滴定に用い, 残りは放射能測定に用いた。本実験において脂肪酸合成系に INH を添加したものでは高級脂肪酸全体への $1-^{14}\text{C}$ 酢酸の取り込みが低下しており, 各々の脂肪酸への取り込みも均一様に低下していた。(4) ミコバクテリアのコエンザイム A (CoA) 含量— H_{37}Ra 株, BCO 株, NO11755 株, 竹尾株, NO607 株, Phlei 株等の煮沸抽出液を用いて, これらの菌体に含まれる CoA 量を測定した。方法はスルファニルアミドのアセチル化を利用する Kaplan and Lipmann 氏法に従つた。ミコバクテリアにも多量の CoA が含まれていることがわかり, 菌株によりその含量に差のあることを認めた。(5) 酢酸の活性化酵素 (アセトキナーゼ) に及ぼす INH の影響—竹尾株から木村等の方法に従つて酢酸活性化酵素を調製し, この酵素とマグネシウムイオンの存在下で酢酸と ATP から生成されるアセチル炭酸をヒドロキサム酸法で測定した。酢酸活性化酵素により生成されるアセチル炭酸の量は INH や硫酸ジヒドロストربتマイシンに依つては影響をうけなかつた。

総 括 並 び に 考 按

ミコバクテリアに INH を作用させた場合に菌体から抽出される脂質量は減少する。菌体総脂質量の減少を来す原因としては種々の過程が考えられるが, 培地中に INH が存在することにより菌体脂質が培地の方へ移行し易くなるという可能性は実験(1)の結果から否定された。寧ろ菌体と培地の両方の脂質量が減少していた。これに関連して, 脂肪酸に及ぼす INH の影響を検討した。実験(2)から INH 作用菌体の高級脂肪酸総量の減少を認めた。この機構を明らかにせんとして, $1-^{14}\text{C}$ 酢酸の高級脂肪酸への取り込みに及ぼす INH の影響を実験(3)により検討したところ, INH は脂肪酸合成の初期の段階において, 或いは合成系の何らかの経過において影響を及ぼすものと想定された。次に, 脂肪酸の活性化の際に重要な役割を演ずるところの CoA 量をミコバクテリア菌体について測定した(実験 4)。ミコバクテリアのアセトキナーゼに対しては抗結核剤は殆んど影響を及ぼさなかつた(実験 5)ことから, INH 作用菌体の高級脂肪酸量減少

の原因は他に求めなければならない。ミコバクテリアの高級脂肪酸合成に關与する酵素については不明の点が多いので、これらの酵素を確認し、精製して段階的に検討する事が必要である。

結 語

ミコバクテリアの高級脂肪酸に及ぼすINHの影響をガスクロマトグラフィーおよび脂肪酸生成実験により検討した結果次の事を知つた。(1)INH作用菌の高級脂肪酸が減少している。
(2)1-¹⁴C酢酸の高級脂肪酸への取り込みはINHの存在下で減少する。

審 査 結 果 の 要 旨

著者は、近來結核菌の脂質の生物学的活性が重視さるに至つた事に鑑み、抗結核剤として最も有効なイソニコチン酸ヒドラジッド（イソニアジッド）の作用効果、特にその脂質に及ぼす影響に関して研究を進めている。現在までのところ、この方面の研究業績は少なく、僅かに Russe and Barclay 等によつてイソニアジッド処理結核菌体の脂質が薬剤非処理菌のそれよりも減少していることが報告されているにすぎない。著者の研究は脂質の構成々分の一つである高級脂肪酸を取り挙げ、イソニアジッドに依つて惹起される変化を静的並びに動的な面から追求しており、新しい考えに基づくものである。実験に依つて得られた知見は次の通りである。

一定の条件下でイソニアジッド処理を行つたミコバクテリア竹尾株から抽出される脂質の量は非処理菌からのそれよりも少ない。又、イソニアジッドを含む培地の脂質も少なくなつてゐる。以上の所見は菌体内の脂質がイソニアジッドに依つて或種の変化を受けた事を示しており極めて興味深い。著者は斯様な現象の原因を追求せんとして以下の如く実験を進めた。

イソニアジッド処理並びに非処理竹尾株菌体から抽出される脂肪酸についてガスクロマトグラフィ分析を行い、イソニアジッド処理菌の高級脂肪酸総量が非処理菌のそれよりも減少していることを明らかにした。その際高級脂肪酸の組成に於ては変化を来さないことを認めた。これら高級脂肪酸総量の減少がイソニアジッド処理ミコバクテリアの脂質量減少の一因であることを示しているのに注目される。

竹尾株の粗抽出液による脂肪酸合成系に於て、 C^{14} 標識酢酸の高級脂肪酸への取り込みに対してイソニアジッドは抑制的影響を及ぼす。この実験はこの種の菌に於ける脂肪酸の合成機構並びに脂肪酸合成系に対するイソニアジッドの作用機序等を解明する上に非常に役立つものと思われる。

脂肪酸の代謝に不可欠なコエンザイム A (CoA) の含量は、ミコバクテリア群に関してはこれまで知られていなかったが、著者はこれを測定した。これらの値はミコバクテリアを取り扱う生化学分野に於て大きく貢献するであろう。著者は更にイソニアジッド処理ミコバクテリアの CoA 含量を測定して、薬剤処理下の菌の物質代謝の異常性を指摘している。又脂肪酸合成経路に関与する酵素について実験並びに考察を加えている。

著者の以上の実験結果はミコバクテリアの脂肪酸代謝並びに抗結核剤の作用機序等を明らかにする手掛りとして大いに意義があると思われる。